

TOPOCHEMISCHE UND HISTOTOPOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUM NACHWEIS VON AMINOSÄUREN
IN FILTERPAPIERVERSUCHEN UND IN GEWEBSSCHNITTEN
MIT DER AgNO_3 -ACETON- Ba(OH)_2 -METHANOL-REAKTION

von

HANS-GEORG GERBER

1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. M. Watzka

TOPOCHEMISCHE UND HISTOTOPOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUM NACHWEIS VON AMINOSÄUREN
IN FILTERPAPIERVERSUCHEN UND IN GEWEBSSCHNITTEN
MIT DER AgNO_3 -ACETON- Ba(OH)_2 -METHANOL-REAKTION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

HANS-GEORG GERBER

aus Saarbrücken

MAINZ 1968

Dekan: Professor Dr. Diethelm
Referent: Professor Dr. Müller
Korreferent: Professor Dr. Watzka
Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1967



Gesamtherstellung:

Ditters Bürodienst Mainz

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung und Problemstellung	1
Experimenteller Teil	3
I. Die Filterpapierversuche	3
A. Material und Methodik	3
B. Untersuchungsergebnisse und Besprechung der Befunde	7
II. Die Untersuchungen an Kopfhautschnitten	10
A. Material und Methodik	10
B. Untersuchungsergebnisse und Besprechung der Befunde	11
Zusammenfassung	11
Literaturverzeichnis	13

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In alkalischem Milieu wird Silbernitrat durch verschiedene Substanzen, z.B. durch bestimmte Zucker, zu metallischem Silber reduziert. Führt man derartige Versuche im Reagenzglas durch, so schlägt sich das bei der Reaktion entstehende, zunächst amorphe Silber als sogenannter Silberspiegel an der Glaswand nieder. Nimmt man die gleiche Reaktion mit an Filterpapier fixierten Substanzen vor, so erhält man an der Stelle, wo der reduzierende Stoff aufgetropft worden war, einen braunschwarzen Fleck. Dieser besteht aus einem feinen Niederschlag von amorphem Silber. Bei derartiger Prüfung wasserlöslicher Substanzen auf ihre reduzierenden Eigenschaften wird man zweckmäßigerweise mit möglichst wasserarmen Reagenzlösungen arbeiten, damit keine Dislokation der an das Filterpapier fixierten Stoffe erfolgt. Solche Versuche wurden von MÜLLER, PUSCH und STILLER mit verschiedenen Kohlenhydraten durchgeführt (8, 11, 13, 14, 15). MÜLLER untersuchte mit der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA (12) zuerst Glukose und 3-O-Methylglukose, später auch zahlreiche andere Kohlenhydrate (8, 11). Dabei wurden die Substanzen zunächst bei verschiedenen Temperaturen in einer Bariumhydroxid-Methanol-Lösung an Filterpapier fixiert und anschließend die Filterpapierstreifen bei Tageslicht in eine 2%ige Silbernitrat-Aethanol-Lösung gebracht. Die Reaktion (Schwärzung) erfolgte beispielsweise bei Glukose sofort, bei 3-O-Methylglukose dagegen überhaupt nicht oder nur sehr schwach, das heißt sie wurde nicht an das Filterpapier fixiert. Auch die getesteten Zuckerphosphate reagierten nur sehr gering. Praktisch die gleichen Ergebnisse erzielte auch STILLER, der neben den von MÜLLER untersuchten Substanzen auch N-Acetylglukosamin und einige weitere Zuckerphosphate testete (14, 15).

MÜLLER und PUSCH führten dann ähnliche Untersuchungen mit zahlreichen wasserlöslichen Kohlenhydraten mittels der von MÜLLER entwickelten Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion durch (11, 13). Dabei entfiel ein spezieller Fixierungsprozeß. Die Testpapierstreifen wurden zunächst in eine Silbernitrat-Aceton- und anschließend in eine Bariumhydroxid-Methanol-Lösung gebracht. Es zeigte sich, daß bei Verwendung sehr wasserarmer Lösungsmittel keine Dislokation der aufgetropften Kohlenhydrate erfolgte und so auch ein topochemischer Nachweis der 3-O-Methylglukose geführt werden konnte. Die Versuchsergebnisse mit der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA (MÜLLER und STILLER) und die Befunde, die mittels der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion (MÜLLER und PUSCH) gewonnen wurden, sind in Tabelle 1 einander gegenübergestellt.

Nachdem es gelungen war, Glukose in einer Bariumhydroxid-Methanol-Lösung an Filterpapier zu fixieren und mit der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA (MÜLLER 1955) nachzuweisen, versuchten verschiedene Autoren mit dieser Reaktion einen positiven Reaktionsausfall in tierischem Gewebe zu erhalten. Untersuchungen dieser Art wurden angestellt von MÜLLER an der Leber, an der Niere und am Darm (6, 7), von GEYER an der Niere (2), von EHRENBRAND an der Milchdrüse (1) und in jüngster Zeit von LANGE am Kleinhirn, am gesamten ZNS und an der Niere (3, 4, 5), an der Niere im Vergleich mit der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion nach MÜLLER. Die Ergebnisse waren durchweg positiv.

Auch mit Hilfe der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion lassen sich eine gewisse Zeit nach peroraler Verabreichung im Darm die resorbierten Kohlenhydrate, z. B. Xylit, nachweisen (10). Natürlich darf dann nicht die übliche Technik der Formolfixierung angewandt werden - hierbei würde der wasserlösliche Xylit aus den Zellen der Darmschleimhaut herausgelöst werden, sondern es kommt nur die Gefrierschnittmethode mit anschließender Gefriertrocknung in Frage, da hierbei keine Dislokation des Xylit erfolgt. Die gleichen Überlegungen gelten sinngemäß für Untersuchungen, die mit der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA an Gewebsschnitten durchgeführt werden. Nach Beendigung einer der beiden Reaktionen sieht man im Mikroskop beispielsweise die Zellen der Dünndarmschleimhaut von einer braunschwarzen Masse erfüllt, die mit dem am Ort der Reaktion entstandenen Silber identisch ist. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem histotopochemischen Nachweis wasserlöslicher Kohlenhydrate.

Nun erhebt sich die Frage, ob der topochemische Nachweis von Zuckern mit der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion nicht durch andere, ebenfalls reduzierend wirkende und in den Zellen anwesende Substanzen gestört oder überlagert werden kann. Hierbei denkt man in erster Linie an die Aminosäuren. So soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob unter gleichen Versuchsbedingungen die Aminosäuren mit den angegebenen Reagenzien eine ähnliche Reaktion zeigen wie die Kohlenhydrate (13). Aus der Kenntnis der Struktur und der chemischen Eigenschaften der Aminosäuren läßt sich schließen, daß wahrscheinlich nur bestimmte Aminosäuren, etwa die schwefelhaltigen oder die mit einer freien Hydroxylgruppe behafteten, in alkalischem Milieu mit Silbernitrat unter der Bildung von metallischem Silber reagieren. Weiter geht es darum, ob bei einem positiven Ausfall der Reaktion die Aminosäuren schwächer, genau so stark oder gar stärker als die Kohlenhydrate reagieren. Diese Fragen lassen sich durch topochemische Untersuchungen der auf

Filterpapier aufgetropften Aminosäuren in wasserarmem Milieu klären. Reagenzien sind hier wie bei den entsprechenden Versuchen mit Kohlenhydraten Silbernitrat-Aceton- und Bariumhydroxid-Methanol-Lösungen von unterschiedlicher Konzentration (11, 13). Nach Beendigung der Filterpapierversuche wird bei positivem Reaktionsausfall versucht, in tierischem Gewebe die erfaßten Aminosäuren nachzuweisen.

Der sicherste lokalisierte Nachweis einer Substanz in tierischem Gewebe, sei es eines Zuckers oder einer Aminosäure, gelingt mit Hilfe der Autoradiographie, nachdem zuvor der zu untersuchende Stoff mit C^{14} oder mit H^3 radioaktiv markiert worden ist. Derartige Versuche hat MÜLLER mit C^{14} -markierter Galaktose und H^3 -markierter 3-0-Methylglukose am Rattendarm durchgeführt (9). Auf diese Weise läßt sich exakt der Weg einer vorgegebenen Substanz in verschiedenen Geweben verfolgen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die durchgeführten Untersuchungen gliedern sich in zwei Abschnitte: Zunächst wurde eine Reihe von Aminosäuren im Filterpapierversuch getestet, anschließend wurde versucht, an Kopfhautschnitten die erfaßten Aminosäuren nachzuweisen.

I. DIE FILTERPAPIERVERSUCHE

A. Material und Methodik

Die Untersuchungen wurden mit den Lösungen der in Tabelle 2 zusammengestellten Aminosäuren durchgeführt. Neben dem Molekulargewicht enthält die Tabelle auch Angaben über die Löslichkeit der Substanzen in Wasser.

Die Lösungen der Aminosäuren wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Bei den schwer löslichen Aminosäuren Leucin, Phenylalanin, Hippursäure, Cystin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Histidin erfolgte ein tropfenweiser Zusatz von Ammoniak, um die Löslichkeit dieser Substanzen zu erhöhen. Der Zusatz der Hydroxylionen bewirkt eine Verschiebung der innermolekularen Ladungsverhältnisse zugunsten der anionischen Form, was mit einer besseren Wasserlöslichkeit einhergeht. Die erhaltenen Lösungen wurden dann mittels Pipetten auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetropft. Die Tropfen enthielten durchschnittlich 0,006 ml Lösung, sie verteilten sich im Filterpapier auf einer Fläche von etwa 1 cm Durchmesser. Die Verteilung der Aminosäuren und der Lösungsmittelkontrollen auf den Filterpapierstreifen geht aus der Abbildung 1 hervor.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse mit der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA (MÜLLER und STILLER) und derjenigen mit der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion (MÜLLER und PUSCH).

Substanz	Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA		AgNO ₃ -Aceton-Ba(OH) ₂ -Methanol-Reaktion	
	MÜLLER	STILLER	MÜLLER	PUSCH
Formol	(+)	Ø	++	++
Aethylenglykol	-	Ø	-	-
Glycerin	-	Ø	+	+
Arabinose	++	++	++	++
Xylose	++	++	++	++
Xylit	++	Ø	+	+
Glukose	++	++	++	++
3-O-Methylglukose	(+)	Ø	+	+
3-O-Aethylglukose	(+)	Ø	+	+
N-Acetylglukosamin	Ø	(+)	Ø	Ø
Fruktose	++	++	+	++
Galaktose	++	++	++	++
Mannose	++	++	+	+
Mannit	++	Ø	+	+
Sorbose	++	Ø	++	+
Sorbit	++	Ø	+	+
Saccharose	-	-	-	-
Lactose	+	Ø	(+)	(+)
3-Phosphoglycerinsäure	Ø	-	Ø	Ø
Glukose-1-phosphat	(+)	(+)	-	-
Glukose-6-phosphat	Ø	(+)	-	-
Fruktose-1-phosphat	(+)	-	Ø	-
Fruktose-6-phosphat	Ø	(+)	Ø	Ø
Fruktose-1, 6-diphosphat	Ø	(+)	-	Ø

Ø = nicht getestet; - = negativer Reaktionsausfall; (+) = schwache Reaktion; + = mittelstarke Reaktion; ++ = starke Reaktion

Tabelle 2: Zusammenstellung der getesteten Aminosäuren. Angaben wie Molekulargewicht, chemische Bezeichnung und Löslichkeit aus "Index Merck", Darmstadt (1961).

Name	Abkürzung	chemische Bezeichnung	MG	L _{aq} (25°)
Glykokoll	Gly	Aminoessigsäure	75, 05	1+4
Alanin	Ala	1-Aminoäthan-carbon-säure	89, 10	1+6
Valin	Val	2-Amino-3-methyl-buttersäure	117, 15	1+11
Leucin	Leu	α -Amino-isocapron-säure	131, 17	1+106(15°)
Phenylalanin	Phe	α -Amino- β -phenyl-propionsäure	165, 20	1+34
Prolin	Pro	Pyrrrolidon- -carbon-säure	115, 13	1+0, 62
Serin	Ser	α -Amino- β -hydroxy-propionsäure	105, 09	1+4
Threonin	Thre	α -Amino- β -hydroxy-buttersäure	119, 12	---
Hippursäure	Hip	Benzoylglykokoll	179, 17	1+165 (18°)
Sarkosin	Sar	Methylaminoessigsäure	89, 09	1+1, 4 (20°)
Cystein	Cys-SH	α -Amino- β -mercapto-propionsäure	121, 16	sehr leicht löslich
Cystin	Cys-S Cys-S	Bis-(α -amino- β -carb-oxyäthyl)-disulfid	240, 30	unlöslich
Methionin	Meth	1-Amino-3-methylmercapto-propioncarbon-säure-(1)	149, 21	1+30
Tryptophan	Try	α -Amino- β -[indolyl-(3)]-propionsäure	204, 23	1+87
Tyrosin	Tyr	α -Amino- β -(hydroxy-phenyl)-propionsäure	181, 19	1+2200
Asparaginsäure	Asp	Aminobernsteinsäure	133, 11	1+200
Glutaminsäure	Glu	1-Amino-propan-dicarbonsäure-(1, 3)	147, 13	1+150 (21°)
Lysin	Lys	α , ϵ -Diamino-n-capron-säure	146, 19	sehr leicht

Fortsetzung Tabelle 2:

Name	Abkürzung	chemische Bezeichnung	MG	$L_{aq}(25^{\circ})$
Arginin	Arg	-Amino- -guanidino- valeriansäure	174,21	1+7
Histidin	His	-Amino- β -imidazolyl- (4 bzw. 5)-propionsäure	155,16	1+25

Da die einzelnen Aminosäuren in ihrem Molekulargewicht teilweise erheblich voneinander abweichen, wurden molekulare Lösungen hergestellt und so die Voraussetzung geschaffen, die Reaktion der verschiedenen Substanzen exakt vergleichen zu können. Für die Versuche wurden 0,1m, 0,01m und 0,001m Lösungen hergestellt. Zur Kontrolle wurde das Lösungsmittel, also bidestilliertes Wasser beziehungsweise ammoniakhaltiges Wasser aufgetropft. Nach dem Auftropfen wurden die Filterpapierstreifen luftgetrocknet. Die Durchführung der Versuche erfolgte mit Silbernitrat-Aceton- und Bariumhydroxid-Methanol-Lösungen verschiedener Konzentration. Sie wurden folgendermaßen hergestellt:

1) Die Silbernitrat-Aceton-Lösungen

2g (0,2g; 0,02g) Silbernitrat zur Analyse wurden mit 100 ml Aceton zur Analyse 10 Minuten lang geschüttelt. Mit dem jeweiligen Dekantat wurden die einzelnen Reaktionen durchgeführt.

2) Die Bariumhydroxid-Methanol-Lösungen

5g (0,5g; 0,05g) Bariumhydroxid zur Analyse wurden mit 100 ml Methanol zur Analyse 10 Minuten lang geschüttelt. Der Ansatz wurde filtriert und das klare Filtrat für die Reaktionen verwendet.

Zum Fixieren der mit den vorgenannten Reagenzien behandelten Filterpapierstreifen diente eine Lösung von 5g Natriumthiosulfat zur Analyse in 100 ml destilliertem Wasser, in der die Streifen 10 Minuten verblieben. Nach dem Fixierungsprozeß wurde mindestens 20 Minuten lang in schwach strömendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden die Papiere luftgetrocknet und auf Zeichnarkarton aufgeklebt.

Mit den betropften und getrockneten Filterpapierstreifen und den genannten Reagenzlösungen wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt.

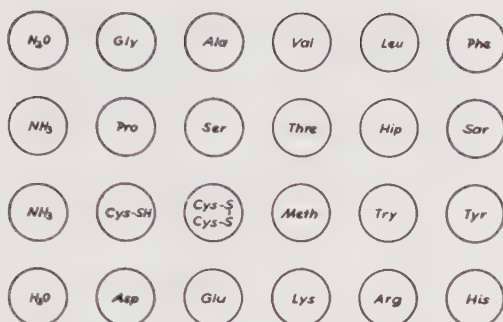


Abbildung 1: Schema, nach dem die Aminosäurelösungen und die Lösungsmittel auf Filterpapier aufgetropft wurden.

		$Ba(OH)_2$ -Methanol					
		10"	20"	100"	5'	10'	60'
$AgNO_3$ -Aceton	10"						
	20"						
	100"						
	5'						
	10'						
	60'						

Abbildung 2: Reaktionsschema, das sich aus den Einwirkungszeiten der $AgNO_3$ -Aceton- und der $Ba(OH)_2$ -Methanol-Lösung bei gleichbleibender Temperatur dieser Lösungen ergibt.

AgNO_3 - Aceton- Lösung	Ba(OH)_2 - Methanol- Lösung
Zimmertemperatur	Zimmertemperatur
	+3°C
	-16°C
+3°C	Zimmertemperatur
	+3°C
	-16°C
-16°C	Zimmertemperatur
	+3°C
	-16°C

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Temperaturvariationen der Reagenzlösungen

		Ba(OH)_2 - Methanol - Lösung (22°C)		
		kurze Einwirkungszeit 10", 20"	mittlere Einwirkungszeit 100", 5'	lange Einwirkungszeit 10', 60'
AgNO ₃ - Aceton - Lösung (22°C)	kurze Einwirkungszeit 10", 20"	nur geringe Reaktion	gute Reaktion	noch gute Reaktion
	mittlere Einwirkungszeit 100", 5'	fast gute Reaktion	optimale Reaktion	überschießende Reaktion
	lange Einwirkungszeit 10', 60'	gute Reaktion	noch gute Reaktion	nicht mehr verwertbar

Abbildung 4: Übersicht über die Abhängigkeit der Reaktionsintensität von der Einwirkungszeit der AgNO_3 -Aceton- und der Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung bei Zimmertemperatur.

1. Versuchsreihe

Zur Untersuchung gelangten Filterpapierstreifen, die jeweils mit 0,1m, 0,01m und 0,001m Testlösung betropft worden waren. Die Reaktion mit den unterschiedlich konzentrierten Silbernitrat-Aceton- und Bariumhydroxid-Methanol-Lösungen wurde bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß durchgeführt. Die Einwirkungsdauer der Silbernitrat-Aceton-Lösungen betrug stets 100 Sekunden, die der Bariumhydroxid-Methanol-Lösungen 10, 20 und 100 Sekunden sowie 5, 10 und 60 Minuten.

2. Versuchsreihe

Im Hauptversuch wurden Filterpapierstreifen untersucht, die mit 0,1m und 0,01m Aminosäurelösungen betropft worden waren. Als Reagenzlösungen dienten die mit 2g Silbernitrat in 100 ml Aceton und die mit 5g Bariumhydroxid in 100 ml Methanol angesetzten Lösungen. Die Einwirkungszeiten betrugen für beide Lösungen 10, 20 und 100 Sekunden sowie 5, 10 und 60 Minuten. Daraus ergibt sich das in Abb. 2 dargestellte Reaktionsschema. Die Temperatur der Reagenzlösungen wurde gemäß Abb. 3 verändert. Die Reaktionen wurden stets unter Lichtabschluß durchgeführt.

Zusammengefaßt war also der Untersuchungsgang folgender:

- 1) Auftropfen der Aminosäurelösungen und der Lösungsmittel auf Whatman-Papier Nr. 1, anschließend Luftrocknen der feuchten Papierstreifen.
- 2) Einbringen der trockenen Papierstreifen in die Silbernitrat-Aceton-Lösung.
- 3) Einbringen der Papierstreifen von der Silbernitrat-Aceton- direkt in die Bariumhydroxid-Methanol-Lösung.
- 4) Fixieren in 5%iger Natriumthiosulfatlösung.
- 5) Wässern in schwach fließendem Leitungswasser.
- 6) Luftrocknen der Papierstreifen und anschließendes Aufkleben auf Zeichenkarton.

B. Untersuchungsergebnisse und Besprechung der Befunde

Von den getesteten Aminosäuren reagierten konstant nur zwei: Cystein und Cystin. Da den Untersuchungen molare Lösungen der Aminosäuren zugrunde liegen, zeigen die positiven Cystinflecke eine etwa doppelt so hohe Farbtintensität wie die Cysteinflecke. Das deutet darauf hin, daß während der Reaktion die S-S-Brücke des Cystins aufgebrochen wird und so letztlich aus einem Mol Cystin zwei Mol Cystein entstehen, die dann die eigentliche Reaktion geben. Die Farbe dieser Cysteinflecke schwankt in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zwischen hellbraun bei kurzen und braunschwarz bei langen Einwirkungszeiten. Ihre Farbtiefe ist jedoch wesentlich geringer als bei den

Flecken, die man bei den entsprechenden Untersuchungen mit Kohlenhydraten erhält (11, 13). Mit Hilfe der durchgeführten Experimente läßt sich zeigen, daß die Dynamik und damit der Ausfall der Reaktion im wesentlichen von vier Fakten abhängt:

1. von der Konzentration (Molarität) der aufgetropften Aminosäurelösungen;
2. von der Stärke der Reagenzlösungen;
3. von der Temperatur der Reagenzlösungen;
4. von der Einwirkungsdauer der Reagenzien.

1. Abhängigkeit der Reaktion von der Konzentration der Testlösungen

Der Ausfall der Reaktion hängt von der Konzentration der untersuchten Testlösungen ab. Mit steigender Molarität der Aminosäurelösungen nimmt die Reaktionsintensität bei gleicher Einwirkungsdauer und gleichbleibender Temperatur der Reagenzlösungen deutlich ab. Dies geht aus Bildung 5 klar hervor.

2. Abhängigkeit der Reaktion von der Stärke der Reagenzlösungen

Weiterhin hängt das Ausmaß der Reaktion von der Konzentration der Reagenzlösungen ab. Je schwächer die Reaktionslösungen sind, desto zögernder tritt bei gleichbleibender Konzentration der Testlösungen und bei konstanter Temperatur die Reaktion ein. Dabei spielt offenbar die Stärke der Bariumhydroxid-Methanol-Lösung eine vordergründige Rolle, wie dies aus Abbildung 6 ersichtlich ist. Die Angaben über die Konzentration der Reagenzlösungen beziehen sich nicht auf die absolut gelösten Mengen an Silbernitrat und Bariumhydroxid, sondern auf diejenigen, die zum Ansetzen der Lösungen verwendet wurden.

3. Abhängigkeit der Reaktion von der Temperatur und der Einwirkungsdauer der Reagenzlösungen

Um den Einfluß der Temperatur und der Einwirkungsdauer der Reagenzien auf den Ablauf der Reaktion zu demonstrieren, wurden die Testpapierstreifen bei verschiedenen, innerhalb einer Serie jedoch gleichbleibenden Temperaturen nach einem bestimmten Schema (siehe Abbildung 2) unterschiedlich lange in der Silbernitrat-Aceton- beziehungsweise Bariumhydroxid-Methanol-Lösung belassen. Nach dem Fixieren, dem Wässern und dem Lufttrocknen wurden die Filterpapierstreifen entsprechend dem Reaktionsschema auf Zeichenkarton aufgeklebt. Vergleicht man nun den Ausfall der Reaktion bei den verschiedenen Temperaturen der Reagenzlösungen, so kommt man zu folgender Feststellung (Abbildung 7 und 8):

1. Je tiefer die Temperatur der Bariumhydroxid-Methanol-Lösung ist, desto schwächer fällt die Reaktion aus.
2. Entsprechend niedrige Temperaturen der Silbernitrat-Aceton-Lösung haben nicht denselben Effekt wie die der Bariumhydroxid-Methanol-Lösung.

+22°C		$Ba(OH)_2$ -Methanol 5,0/100,0						Testlösungen
		10"	20"	100"	5'	10'	60'	
$AgNO_3$ -Aceton 2,0/100,0	100"	⊕	(+)	(+)	+	+	×	0,1m Cystein
		⊕	(+)	(+)	+	+	×	Cystin
		⊕	⊕	⊕	(+)	+	×	0,01m Cystein
		⊕	⊕	(+)	(+)	+	×	Cystin
		-	-	-	-	⊕	×	0,001m Cystein
		-	-	-	⊕	⊕	×	Cystin

Abbildung 5: Abhängigkeit der Reaktion von Cystein und Cystin von der Konzentration der Testlösungen

⊕ = schwache, (+) = mittlere, + = starke und
 × = überschießende, nicht mehr verwertbare
 Reaktion; - = negativer Reaktionsausfall
 $AgNO_3$ -Aceton-Lösung (2,0/100,0) und
 $Ba(OH)_2$ -Methanol-Lösung (5,0/100,0) bei
 Zimmertemperatur

AgNO ₃ - Aceton 100"	Testlösungen 0,1m		Ba(OH) ₂ - Methanol 100" und 5'
	Cystein	Cystin	
2,0/100,0	(+) (+)	(+) (+)	5,0/100,0
0,2/100,0	⊕ ⊕	⊕ ⊕	0,5/100,0
0,02/100,0	- -	- ⊕	0,05/100,0

Abbildung 6: Abhängigkeit der Reaktion von Cystein und Cystin von der Konzentration der Reagenzlösungen bei Zimmertemperatur

⊕ = schwache, (+) = mittlere und + = starke Reaktion; - = negativer Reaktionsausfall

AgNO₃-Aceton 100 Sekunden, Ba(OH)₂-Methanol 100 Sekunden und 5 Minuten

Ba(OH) ₂ - Methanol 5,0/100,0												

		$Ba(OH)_2$ -Methanol 5,0/100,0																							
		+22°C						+3°C						-16°C											
		10"	20"	100"	5'	10'	60'	10"	20"	100"	5'	10'	60'	10"	20"	100"	5'	10'	60'						
		AgNO ₃ -Aceton 2,0/100,0	+22°C							+3°C							-16°C								
10"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
20"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
100"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
5'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
10'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
60'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
10"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
20"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
100"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
5'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
10'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
60'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
10"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
20"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
100"	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
5'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
10'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						
60'	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+						

Abbildung 8: Reaktion von Cystin (0,1m) bei verschiedenen Temperaturen der Reagenzlösungen

⊕ - schwache, (+) - mittlere, + - starke und X - überschießende, nicht mehr verwertbare Reaktion; - = negativer Reaktionsausfall

+22°C		Ba(OH) ₂ -Methanol 5,0/100,0					
		10''	20''	100''	5'	10'	60'
AgNO ₃ -Aceton 2,0/100,0		Cystein 0,1m					
	10''	⊕	⊕	⊕	(+)	(+)	X
	20''	⊕	⊕	⊕	(+)	(+)	X
	100''	⊕	(+)	(+)	(+)	+	X
	5'	(+)	(+)	(+)	(+)	+	X
	10'	(+)	(+)	(+)	+	+	X
	60'	+	+	+	+	+	X
		Cystin 0,1m					
	10''	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	(+)
	20''	⊕	⊕	⊕	⊕	(+)	(+)
	100''	⊕	(+)	(+)	(+)	(+)	X
	5'	(+)	(+)	(+)	+	+	X
	10'	(+)	(+)	(+)	+	+	X
	60'	+	+	+	+	+	X

Abbildung 9: Reaktion von Cystein und Cystin bei Zimmertemperatur in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Reagenzlösungen

⊕ - schwache, (+) - mittlere, + - starke und
 X - überschießende, nicht mehr verwertbare
 Reaktion

Bezüglich der Abhängigkeit der Reaktion von der Einwirkungsdauer der Reagenzien läßt sich folgendes feststellen (Abbildung 9):

1. Die Reaktion fällt um so stärker aus, je länger die Testpapierstreifen in der Bariumhydroxid-Methanol-Lösung verbleiben.
2. Entsprechende Verweildauer der Streifen in der Silbernitrat-Aceton-Lösung hat nicht den gleichen Effekt.
3. Bei langen Reaktionszeiten verwischt sich das Bild. Es reagieren außer Cystein und Cystin auch ein Teil der übrigen Aminosäuren und sogar die Lösungsmittelkontrollen. Weiterhin färben sich die Filterpapierstreifen dunkelbraun, so daß sich die etwas dunkleren Cystein- und Cystinflecke nicht mehr deutlich abheben. Im Bereich einiger Aminosäuren entstehen weiße Flecke, die von einem graubraunen Ring umgeben sind. Ausschlaggebend für diese Effekte ist in jedem Fall die lange Einwirkungsdauer der Bariumhydroxid-Methanol-Lösung.

Man kann die Abhängigkeit des Reaktionsausfalles von der Einwirkungsdauer der Reagenzien bei jeweils einer bestimmten Temperatur durch folgende Übersicht darstellen: (siehe Abbildung 4)

Von den in Filterpapierversuchen getesteten Aminosäuren reagieren also in einem gewissen zeitlichen, vor allem nach oben beschränktem Bereich immer nur zwei Aminosäuren: Cystein und Cystin. Dabei ist die Farbintensität dieser beiden Flecken wesentlich geringer als bei denjenigen, die man bei entsprechenden Untersuchungen mit Kohlenhydraten erhält (11, 13). Man kann also postulieren, daß die Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein und Cystin den Nachweis der Kohlenhydrate in tierischem Gewebe mittels der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion nicht beeinträchtigen. Ob Cystein oder Cystin den Zuckernachweis stören, hängt von ihrer Konzentration in den zu untersuchenden Geweben ab. Mengen, die im Vergleich zu Glukose beispielsweise gering sind, stören den Zuckernachweis keineswegs; denn offensichtlich ist die reduzierende Kraft der meisten Zucker größer als die von Cystein und Cystin.

II. DIE UNTERSUCHUNGEN AN KOPFHAUTSCHNITTEN

A. Material und Methodik

In Modellversuchen mit auf Filterpapier aufgetropften Aminosäurelösungen wurde also festgestellt, daß von den getesteten Substanzen nur Cystein und Cystin mit der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion zu erfassen waren. Im Anschluß daran wurden nun entsprechende Untersuchungen an Geweben durchgeführt, die reichlich Cystein beziehungsweise Cystin, in der Regel in Proteine eingebaut, enthalten. Dazu bot sich in erster Linie die dicht behaarte Kopfhaut an, denn bekanntlich sind die Haare reich an Cystin, das beim Haarwachstum in der Wurzelscheide in das Haar eingebaut wird.

Zu diesem Zweck wurde von einem Stück Kopfhaut zunächst das Fettgewebe abpräpariert. Das so vorbereitete Hautstück wurde im Kryostaten eingefroren und anschließend 10 μ dicke Schnitte hergestellt, die dann noch 48 Stunden lang gefriergetrocknet wurden. Diese Methode wurde deshalb gewählt, weil es dabei nicht zu einer Dislokation wasserlöslicher Substanzen kommt. Das im Gewebe vorhandene Wasser wird dabei aus dem festen (Eis) sofort unter Umgehung der flüssigen Phase in den gasförmigen Zustand (Dampf) übergeführt. So bilden die in den Zellen und in der Zwischensubstanz gelösten Stoffe in den nunmehr trockenen Schnitten einen feinen amorphen Niederschlag. Auf diese Weise wurden die gleichen Voraussetzungen geschaffen, wie sie vor der Ausführung der Filterpapierversuche bestanden haben. Entsprechend wurden dann auch die trockenen Schnitte zunächst in die Silbernitrat-Aceton- und danach in die Bariumhydroxid-Methanol-Lösung eingebracht, jeweils für verschiedene Zeiten. Verwendet wurden die Silbernitrat-Aceton-Lösung, die 2g Silbernitrat in 100 ml Aceton, und die Bariumhydroxid-Methanol-Lösung, die 5g Bariumhydroxid in 100 ml Methanol im Ansatz enthielten. Die Reaktion wurde stets bei Zimmertemperatur und im Dunkeln durchgeführt. Nach dem Fixieren und dem Wässern wurde mit Kernechtrot eine Minute lang gegengefärbt, um die Zellstrukturen, vor allem die Zellkerne, besser sichtbar zu machen, und dann die Präparate nach der üblichen Technik eingedeckt. Bei der mikroskopischen Auswertung der so gewonnenen histologischen Präparate wurde besonders auf die Haarfollikel und ihre Anhangsgebilde, die Talgdrüsen, geachtet. Zum Vergleich standen Schnitte des gleichen Kopfhautstückes zur Verfügung, die nur mit Kernechtrot gefärbt worden waren.

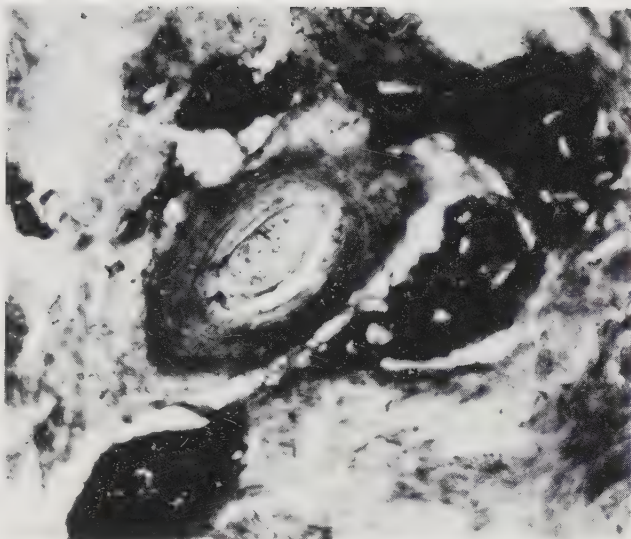


Abbildung 10: Menschliche Kopfhaut. Reaktion nach MÜLLER: Silber-
nitrat-Aceton (2,0/100,0) 60 Minuten, Bariumhydroxid-Methanol(5,0/100,0)
60 Minuten, Zimmertemperatur. Neben der dargestellten Haarwurzel er-
kennt man die tiefgeschwärzten Talgdrüsen.
Vergrößerung 120:1, nachvergrößert.



Abbildung 11: Menschliche Kopfhaut. Reaktion nach MÜLLER: Silbernitrat-Aceton(2,0/100,0) 100 Sekunden, Bariumhydroxid-Methanol(5,0, 100,0) 100 Sekunden, Zimmertemperatur. Hier erkennt man die beginnende Reaktion eines Haarbalges mit den ihn umgebenden Talgdrüsen. Vergrößerung 120:1, nachvergrößert.

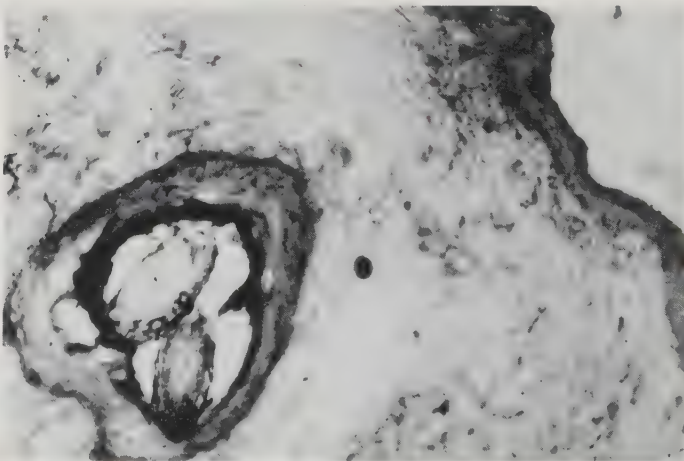


Abbildung 12: Menschliche Kopfhaut. Reaktion nach MÜLLER: Silbernitrat-Aceton(2,0/100,0) 60 Minuten, Bariumhydroxid-Methanol(5,0/100,0) 60 Minuten, Zimmertemperatur. Neben dem elektiv dargestellten Haarfollikel erkennt man deutlich die positive Reaktion des verhornenden Plattenepithels. Vergrößerung 120:1, nachvergrößert.

B. Untersuchungsergebnisse und Besprechung der Befunde

Bei der mikroskopischen Betrachtung der wie vorstehend behandelten Kryostatsschnitte menschlicher Kopfhaut konnte folgendes festgestellt werden:

1. Die Zellen der Haarwurzelscheiden und vor allem die Talgdrüsen zeigen eine starke Reaktion, wie dies aus Abbildung 10 ersichtlich ist.
2. Auch das verhornende Plattenepithel der Kopfhaut reagiert positiv im Sinne einer Schwärzung der betreffenden Strukturen (Abbildung 12).

Damit ist also erwiesen, daß sich die beiden in den Filterpapierversuchen ermittelten Aminosäuren Cystein und Cystin bei entsprechend hoher Konzentration durchaus auch in tierischem Gewebe nachweisen lassen. Dazu muß jedoch einschränkend betont werden, daß ein sicherer histotopochemischer Nachweis von Cystein beziehungsweise Cystin nur geführt werden kann, wenn die betreffende Substanz radioaktiv markiert und anschließend über längere Zeit verfüttert wird. Dabei reichert sie sich an Orten mit physiologisch hoher Konzentration entsprechend an und kann mit Hilfe der Autoradiographie sicher nachgewiesen werden. Führt man beide Untersuchungsmethoden am gleichen Objekt nebeneinander durch, so ließe sich damit feststellen, ob die Schwärzungen, die mit der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion erzielt werden, tatsächlich den vermuteten Aminosäuren entsprechen.

Aus den Abbildungen 10 und 11 geht hervor, daß kurze Reaktionszeiten nur eine schwache, eben angedeutete Reaktion ergeben, während die Reaktionsintensität bei langen Einwirkungszeiten der Reagenzlösungen entsprechend groß ist. Dieses von den Filterpapierversuchen abweichende Verhalten läßt sich darauf zurückführen, daß die Reagenzien beim Gewebsschnitt zunächst in die Zellen eindringen müssen und erst dann ihre Wirkung entfalten können. An den Filterpapierstreifen dagegen sitzen die Aminosäuren oberflächlich an den Zellulosefasern und sind so dem Einfluß der Reagenzlösungen direkt ausgesetzt.

ZUSAMMENFASSUNG

Zwanzig Aminosäuren werden in wässriger Lösung auf Filterpapier aufgetropft und mit der Silbernitrat-Aceton-Bariumhydroxid-Methanol-Reaktion auf reduzierende Eigenschaften hin untersucht. Dabei wird geprüft,

1. welche Aminosäuren erfaßt werden;
2. welchen Einfluß die Einwirkungsdauer, die Temperatur und die Konzentration der Reagenzien auf den Ausfall der Reaktion haben;

3. ob die Reaktionsintensität der erfaßten Aminosäuren diejenige der Zucker erreicht oder nicht.

Die Untersuchungen ergeben:

1. Von den getesteten Aminosäuren reagieren konstant nur Cystein und Cystin.
2. Die Einwirkungsdauer, die Temperatur sowie die Konzentration der Reagenz-lösungen beeinflussen das Ausmaß der Reaktion.
3. Die Reaktion von reduzierenden Zuckern kann nur durch sehr hohe Konzen-trationen von Cystein und Cystin beeinflußt werden, wie sie nur in ganz wenigen Geweben physiologischerweise erreicht werden.

In einem zweiten Abschnitt wird versucht, an gefriergetrockneten Kryostat-schnitten menschlicher Kopfhaut Cystein beziehungsweise Cystin nachzuweisen. Dabei zeigt sich, daß neben den Wurzelscheiden der Haare und den Talgdrüsen auch das verhornende Plattenepithel deutlich positiv reagiert. Es wird gefol-gert, daß hierbei Cystin nachgewiesen wird. Ein sicherer histotopochemischer Nachweis ist jedoch nur mit der radioaktiv markierten Substanz möglich.

LITERATURVERZEICHNIS

1. EHRENBRAND, F.: Über den Ausfall der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA in der laktierenden Milchdrüse des Goldhamsters.
Acta histochem. 12, 337-339 (1961)
2. GEYER, G.: Untersuchungen zum histochemischen Glukose-nachweis in der Niere.
Acta histochem. 9, 329-338 (1960)
3. LANGE, W.: Zur Topochemie der reduzierbaren Substanzen im Kleinhirn der weißen Ratte nach Glukose-injektionen.
Acta histochem. 24, 320-328 (1966)
4. LANGE, W.: Zur Topochemie der reduzierbaren Substanzen im ZNS der weißen Ratte nach Glukoseinjektionen.
Verh. anat. Ges. 61, 375-381 (1967)
5. LANGE, W.: Zur Topochemie der reduzierbaren Substanzen in der Niere der weißen Ratte nach Glukoseinjektionen.
Verh. anat. Ges. (im Druck)
6. MÜLLER, G.: Über den histotopochemischen Nachweis von Glukose in der Leber und Niere der weißen Maus.
Acta histochem. 2, 73-80 (1955)
7. MÜLLER, G.: Histotopochemische Untersuchungen über die Glukoseresorption im Darm der weißen Maus.
Acta histochem. 3, 165-220 (1957)
8. MÜLLER, G.: Die Fixierung von Glukose und 3-O-Methylglukose an Filterpapier und ihr Nachweis durch die Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA.
Acta histochem. 14, 270-275 (1962)
9. MÜLLER, G.: Über den autoradiographischen Nachweis von C¹⁴-Galaktose und H³-3-O-Methylglukose im Rattendarm.
Acta histochem. 19, 97-103 (1964)

10. MÜLLER, G.: Histotopochemische Untersuchung der Xylitresorption im Rattendarm.
Klin. Wschr. 42, 454-456 (1964)
11. MÜLLER, G.: Der histotopochemische Nachweis wasserlöslicher Kohlenhydrate.
Verh. anat. Ges. 60, 165-173 (1965)
12. OKAMOTO, K.,
KADOTA, J.,
AOYAMA, Z.: Taishitzu Gaku Zasshi 14, 35 (1948)
zit. nach G. GOMORI, Microscopic Histochemistry,
Chicago 1953
13. PUSCH, I.: Der topochemische Nachweis wasserlöslicher Kohlenhydrate im Filterpaierversuch durch die AgNO_3 -Aceton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion.
Med. Diss., Mainz (1964)
14. STILLER, D.: Histotopochemische Untersuchungen zum Nachweis von Monosacchariden
1. Untersuchungen zur Fixierung und zum Nachweis verschiedener Zucker mittels Papierstreifen durch die Reaktion von OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA.
Acta histochem. 21, 299-312 (1965)
15. STILLER, D.: Histotopochemische Untersuchungen zum Nachweis von Monosacchariden
2. Untersuchungen zur Fixierung und zum Nachweis verschiedener Zuckerphosphate mittels Filterpapierstreifen durch die Reaktion von OKAMOTA, KADOTA und AOYAMA.
Acta histochem. 22, 46-52 (1965)

Ich danke Herrn Professor Dr. G. Müller für die freundliche Überlassung des Themas und für seine wertvollen Ratschläge und Hinweise, mit denen er mir die Durchführung der Arbeit sehr erleichtert hat.

LEBENS LAUF

Am 31. März 1935 wurde ich in Saarbrücken als erstes Kind des Oberlandesgerichtsrates Dr. Emil Gerber und seiner Frau Paula, geborene Febel geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Zweibrücken und Landstuhl/Pfalz absolvierte ich die höhere Schule in Landstuhl und Kaiserslautern. Nach erlangter Hochschulreife (3. März 1955) studierte ich zunächst in Heidelberg zwei Semester Philosophie und Psychologie, wandte mich dann aber der Pharmazie zu. Die Pharmazeutische Vorprüfung legte ich am 24. März 1958 in Neustadt/Weinstraße, die Pharmazeutische Prüfung am 26. April 1961 an der Universität in Mainz ab. Danach begann ich ebenfalls an der Universität in Mainz mit dem Studium der Medizin als Zweitstudium. Nach der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung am 11. Oktober 1961 und der Ärztlichen Vorprüfung am 30. April 1963 bestand ich am 24. Januar 1967 die Ärztliche Prüfung. Seit dem 2. Mai 1967 bin ich am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz beschäftigt.

